Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

DER EINFLUSS VON ARZNEIMITTELN AUF DIE DELTA-AMINOLÄVULINSÄURE-SYNTHETASE IN DER RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eva Krauß
aus Stuttgart

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0048

Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

DER EINFLUSS VON ARZNEIMITTELN AUF DIE DELTA-AMINOLÄVULINSÄURE-SYNTHETASE IN DER RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eva Krauß
aus Stuttgart

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. W. Schlote

1. Berichterstatter: Doz. Dr. K. W. Bock
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Remmer
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H. Held

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung S. 4
1. Einfluß von Medikamenten auf die hepatische Porphyrie S. 4
2. Beziehung zwischen delta-Aminolävulinsäure-Synthetase, Hämsynthese und Porphyrie S. 4
3. Fragestellung: Beziehung zwischen der Induktion des Cytochrom-P-450 und der Induktion der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase durch Arzneimittel S. 6

B. Methode S. 8
1. Behandlung der Tiere S. 8
2. Präparation der Homogenate S. 8
3. Biochemische Grundlagen der Bestimmung der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase S. 9
4. Bestimmung der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase im colorimetrischen Test S. 13
5. Bestimmung der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase im radioaktiven Test S. 15
6. Bestimmung von Cytochrom-P-450 S. 18

C. Ergebnisse S. 19
1. Vergleich der Bestimmung der ALA-Synthetase S. 19
a. Zeitkinetik des colorimetrischen Tests S. 19
b. Zeitkinetik des radioaktiven Tests S. 20
c. Vergleich der Bestimmung des colorimetrischen und des radioaktiven Tests im Verlauf der Induktion der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase durch Allylisopropylacetamid S. 21
d. Identifizierung und Reinheitsbestimmung von delta-Aminolävulinsäure S. 23

2. Induktion der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase durch Allylisopropylacetamid bei hungernden und ad libitum gefütterten Ratten S. 24

3. Induktion der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase durch Allylisopropylacetamid bei hungernden und ad libitum gefütterten Ratten. Vergleich mit der Induktion des Cytochrom-P-450 S. 26

4. Induktion der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase durch Phenobarbital bei hungernden und ad libitum gefütterten Ratten. Vergleich mit der Induktion des Cytochrom-P-450 S. 27

5. Induktion der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase und des Cytochrom-P-450 nach chronischer Gabe von Phenobarbital S. 28

D. Diskussion S. 29

E. Zusammenfassung S. 34

F. Literaturverzeichnis S. 35

A. Einleitung

1. Einfluß von Medikamenten auf die hepatische Porphyrie

Es ist bekannt, daß Arzneimittel einen Einfluß auf die hepatische Porphyrie ausüben. Bei Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie kann z.B. durch Barbiturate ein Porphyrieanfall ausgelöst werden. Es wurden Fälle beschrieben, in denen eine bisher unerkannte Porphyrie durch gesteigerten Arzneimittelgebrauch erst zum Vorschein kam.

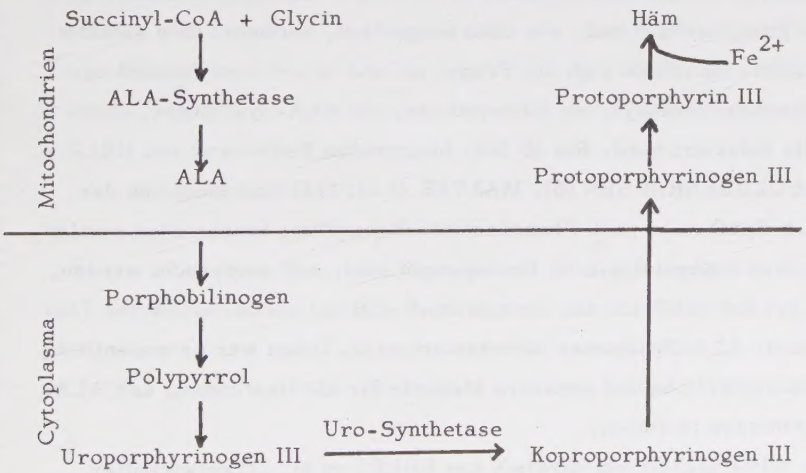
Porphyrien sind Erkrankungen, die auf Störungen des hämsynthetisierenden Systems beruhen. Daher ist die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Arzneimittelmetabolismus und Hämstoffwechsel naheliegend.

2. Beziehung zwischen delta-Aminolävulinsäure-Synthetase, Hämsynthese und Porphyrie

In den letzten Jahren fand die Tatsache immer mehr Beachtung, daß sowohl im Tierexperiment(1,22)als auch beim Menschen (1, 2, 23) mit einer Vielzahl von Medikamenten bei hoher und chronischer Gabe die Aktivität des arzneimittelabbauenden Systems gesteigert werden kann. Es könnte sich dabei um einen Schutzmechanismus des Organismus gegen eine Überflutung mit lipoidlöslichen Substanzen handeln. Bei der Entgiftung von Arzneimitteln spielt das Cytochrom-P-450 eine wesentliche Rolle. An ihm werden Sauerstoff aktiviert, und Arzneimittel hydroxyliert (22). Dadurch werden sie wasserlöslich und können durch die Niere ausgeschieden werden. Bei chronischer Medikamentengabe nimmt die Menge an Cytochrom-P-450 deutlich zu (21). Da Cytochrom-P-450 wie alle Hämoproteine aus dem Cofaktor Häm und einem Apoprotein besteht, muß bei seiner Zunahme sowohl die Häm- als auch die Proteinsynthese gesteigert

werden. Daraus wird klar, daß bei der Induktion des arzneimittelabbauenden Systems die Hämsynthese eine Belastung erfährt. Wie bei vielen biochemischen Prozessen wird auch hier die Geschwindigkeit der Hämsynthese durch die Aktivität und Menge des ersten Enzyms, des sog. Schrittmacherenzyms, bestimmt. Es handelt sich um das Enzym delta-Aminolävulinsäure-Synthetase (ALA-Synthetase). Das Schrittmacherenzym wird gewöhnlich durch die Konzentration des Endproduktes der Synthese, dem Ferro-Protoporphyrin Häm, reguliert. Bei hoher Hämkonzentrierung wird die Menge und Aktivität der ALA-Synthetase erniedrigt, bei erniedrigter Häm-Konzentration erhöht.

Bei der akuten intermittierenden Porphyrie ist bekanntlich die Menge und Aktivität dieses Enzyms vermehrt (20, 24). Es kommt dabei zur Ausscheidung von Vorstufen der Hämsynthese im Harn. Zur Verdeutlichung ist im Folgenden ein Schema der Hämsynthese dargestellt:



Die Synthese der ALA (delta-Aminolävulinsäure) durch die ALA-Synthetase beginnt in den Mitochondrien, da nur in diesen Organellen die erforderlichen Vorstufen (Succinyl-CoA) vorliegen. Auch die Endstufe der Hämsynthese, der Einbau des Fe^{2+} in Protoporphyrin findet in den Mitochondrien statt, was die besondere Bedeutung der Mitochondrien für die Hämsynthese unterstreicht (11). Da die Menge und Aktivität der ALA-Synthetase sehr stark von der intrazellulären Häm-Konzentration abhängt, und damit die ALA-Synthetase ein empfindlicher Parameter der Hämsynthese ist, konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen auf die Bestimmung dieses Schrittmacherenzyms.

3. Fragestellung: Beziehung zwischen der Induktion des Cytochrom-P-450 und der Induktion der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase durch Arzneimittel

Bei der Induktion des arzneimittelabbauenden Enzymsystems im besonderen bei der Induktion des Cytochrom-P-450 nach Behandlung mit Phenobarbital muß, wie oben ausgeführt, vermehrt Häm gebildet werden. Es erhebt sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß das Schrittmacherenzym der Hämsynthese, die ALA-Synthetase, ebenfalls induziert wird. Bei 48 Std. hungernden Ratten war von HELD und OLDERSHAUSEN (8), MARVER et al. (14) eine Induktion der ALA-Synthetase nach Phenobarbital-Behandlung beschrieben worden. Da dies unphysiologische Bedingungen sind, soll untersucht werden, ob bei der Induktion des Cytochrom-P-450 bei normal ernährten Tieren die ALA-Synthetase mitinduziert wird. Dabei war es wesentlich, eine verläßliche und sensitive Methode für die Bestimmung der ALA-Synthetase zu finden.

Es sollte deshalb ein kürzlich von EBERT et al. (3) entwickelter radioaktiver Test geprüft und mit einem von MARVER et al. (15)

veröffentlichten colorimetrischen Untersuchungsverfahren verglichen werden. Mit letzterem konnten die nicht induzierten Enzymspiegel in der Leber nur sehr schwer gemessen werden. Aus diesem Grunde wurde zunächst mit Allylisopropylacetamid, das sich von dem früher als Schlafmittel verwendeten Sedormid ^{R} ableitet, eine experimentelle Porphyrie erzeugt, und der Spiegel der ALA-Synthetase mit beiden Methoden im Verlauf der Porphyrie gemessen. Daraufhin wurde das Verhalten der ALA-Synthetase während der durch Phenobarbital hervorgerufenen Induktion des Cytochrom-P-450 untersucht. Gleichzeitig verglichen wir die Aktivität der ALA-Synthetase in hungernden und ad libitum gefütterten Ratten.

B. Methode

1. Behandlung der Tiere

Für unsere Versuche verwendeten wir 150-200 g schwere männliche Sprague-Dawley Ratten (SIV-Ratten, Ivanovas, Kissleg, Allgäu), die Preßfutter mit 20% Protein (Altromin R, Lage-Lippe, Dtschl) und Wasser ad libitum erhielten.

Kontrolltiere erhielten bis zuletzt Futter, während den als Hungertiere bezeichneten Ratten 40 Std. vor dem Töten das Futter entzogen wurde. Sie wurden in Drahtkäfigen gehalten , um eine Koprophagie zu verhindern. Wasser erhielten sie weiterhin ad libitum.

Injektionslösungen:

Phenolbarbital wurde als 3%ige wässrige Lösung intraperitoneal injiziert (100 mg/kg). Im Dauerversuch bekamen die Ratten täglich eine Injektion.

Allylisopropylacetamid (ein Geschenk der Firma Roche, Basel) injizierten wir als 1,5%ige Lösung in 0,9%iger NaCl (300 mg/kg).

2. Präparation der Homogenate

Um die individuelle Streuung der einzelnen Ratten auszugleichen, stellten wir für jeden Meßwert das Homogenat jeweils aus mindestens zwei Lebern her.

Die Ratten wurden dekapitiert, und der Bauchraum eröffnet. Anschliessend perfundierten wir die Leber durch die Pfortader mit ca. 20 ml 0,9%iger NaCl. Die Lebern wurden exstirpiert und sofort in eisgekühlte 0,9%iger NaCl gelegt. Mit der Schere wurden sie zerkleinert in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und auf einem Sieb getrocknet.

Als Homogenisationspuffer verwendeten wir 0,9%ige NaCl, 0,5 mM EDTA, 5,0 mM Tris-HCl pH 7,4.

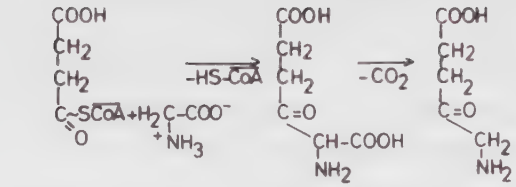
Zur Cytochrom-P-450-Bestimmung homogenisierten wir in 0,25 M Saccharose.

Im colorimetrischen Test homogenisierten wir 3 g Leber in 9 ml Pufferlösung, beim radioaktiven Test 2 g Leber in 98 ml Pufferlösung, bei der Cytochrom-P-450-Bestimmung 2 g Leber in 8 ml Puffer.

Wir verwendeten einen Homogenisator mit Teflonstab (1000 U/min.). In den Versuchen, in denen wir den radioaktiven Test mit dem colorimetrischen verglichen, wurde das Homogenat durch ein 110-maschiges Nylonsiebtuch gefiltert, sonst wurde das Homogenat direkt verwendet.

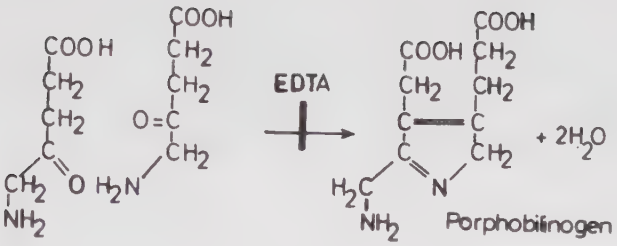
3. Biochemische Grundlagen der Bestimmung der ALA-Synthetase

Wie im Schema der Hämsynthese bereits erwähnt, findet die Synthese der delta-Aminolävulinsäure in den Mitochondrien statt. In diesen Organellen wird im Citronensäurecyclus Succinyl-CoA gebildet. Glycin dringt in die Mitochondrien ein und wird von der prosthetischen Gruppe der ALA-Synthetase, dem Pyridoxalphosphat, wahrscheinlich als Schiff'sche Base gebunden. In dieser Form reagiert Glycin mit Succinyl-CoA zu der sehr labilen delta-Amino-ß-Ketoadipinsäure, die sofort zu delta-Aminolävulinsäure decarboxyliert wird (11). Ein intakter Mitochondrienstoffwechsel ist eine Grundvoraussetzung der Tests.

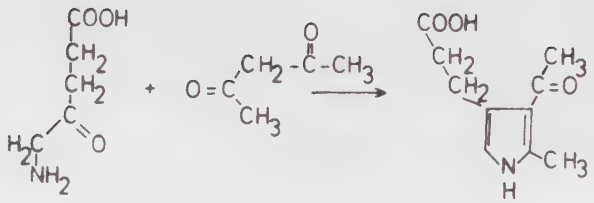


Succinyl-CoA+Glycin — α-Amino-β-Keto-adipinsäure — δ-Amino-lävulinsäure

Die Kondensation von zwei Molekülen delta-Aminolävulinsäure führt unter Abspaltung von zwei Molekülen H_2O zu Porphobilinogen, einem Pyrrolderivat. Diese Weiterreaktion der delta-Aminolävulinsäure wird durch Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) verhindert. Als Komplexbildner reagiert EDTA mit dem Magnesium-Ion der delta-Aminolävulinsäure-Dehydratase und inaktiviert sie.



Zum Nachweis der ALA machten wir uns im colorimetrischen Test folgende Reaktion zunutze: delta-Aminolävulinsäure bildet mit Acetylaceton einen Pyrrolkörper. Dieser wird mit Ehrlich'schem Reagenz(10) colorimetrisch bestimmt.



Neben delta-Aminolävulinsäure entsteht ein zweites Aminoketon nämlich Aminoaceton (15). Die Aminoacetonsynthetase ist ebenfalls ein mitochondriales Enzym und katalysiert die Entstehung von Aminoaceton aus Glycin und Acetyl-CoA. Aminoaceton bildet mit Acetylaceton einen Pyrrolkörper (2,4 Dimethyl-3-Acetylpyrrol), der in die Farbreaktion mit Ehrlichschem Reagenz eingehen und die Meßergebnisse fälschlich erhöht würde. Um dies zu verhindern, wird das Pyrrol aus Aminoaceton säulenchromatographisch entfernt. Ein Anionenaustauscher in Acetatform hält den Pyrrolkörper aus delta-Aminolävulinsäure an ihrer Säuregruppierung zurück. Anschließend wird Pyrrol aus Aminoaceton durch Waschen mit Butanol und Amoniumhydroxyd entfernt. Mit Eisessig-Methanol kann delta-Aminolävulinsäure schließlich allein eluiert werden.

Im radioaktiven Test wird die Tatsache genützt, daß Succinat im

Gegensatz zu Succinyl-CoA die Mitochondrienmembran passieren kann. 2,3^{14}C-Succinat dringt in die Mitochondrien ein und beteiligt sich an deren Stoffwechsel. Außer in die Synthese der delta-Aminolävulinsäure geht 2,3^{14}C-Succinat als ^{14}C-Succinyl-CoA in den Aminosäurestoffwechsel ein. Die ^{14}C-Aminosäuren werden von der ^{14}C-delta-Aminolävulinsäure chromatographisch getrennt. Dabei wird ^{14}C-delta-Aminolävulinsäure mit ihrer freien delta-Aminogruppierung an einen Kationenaustauscher gebunden. EBERT et al. (3) konnten einerseits zeigen, daß bei pH 3,9 die ^{14}C-Aminosäuren von Dowex 50 Harz nicht zurückgehalten werden und andererseits, daß die Bildung von Aminoaceton im 2%igen Homogenat so gering ist, daß sie vernachlässigt werden kann. Im Eluat befindet sich also nur ^{14}C-delta-Aminolävulinsäure, die im Szintillationszähler bestimmt wird.

4. Bestimmung der ALA-Synthetase im colorimetrischen Test (15)

Für eine Bestimmung wurden 2 identische Inkubationsansätze verwendet.

Inkubationsansatz:		Endkonzentration:
0,5M Tris-HCl pH 7,2+0,05M EDTA	0,8ml	100mM Tris-HCl pH 7,2 10mM EDTA
1M Glycin	0,4ml	100mM Glycin
0,9% NaCl	1,8ml	
25%iges Homogenat in 0,9% NaCl + 0,5mM EDTA+10mM Tris-HCl pH 7,4	1,0ml	6,25% Homogenat
Gesamtvolumen	4,0ml	

Die Inkubation wurde in 50 ml Erlenmeyerkölbchen vorgenommen, um eine ausreichende O_2-Sättigung des Homogenats zu erreichen. Es wurde 60 Min. lang in einem Wasserbad bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für eine Bestimmung wurden jeweils zwei Ansätze in ei-

nem Zentrifugenglas, das bereits 2ml 25%ige Trichloressigsäure enthielt, vereinigt. Nach 5 Min. Stehen im Eis wurde das Proteinpräzipitat 10 Min. lang bei 5000Upm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 10 ml 1 M Na-Acetat-Puffer pH 4,6 und 0,5 ml Acetylaceton 20 Min. gekocht. Wir machten die Erfahrung, daß die Reagenzien vor dem Kochen geschüttelt werden müssen, um eine gute Durchmischung und damit eine vollständige Pyrrolbildung zu gewährleisten.

Nach dem Abkühlen wurde die pyrrolhaltige Lösung auf eine Anionenaustauschersäule (Dowex 1-Acetat, Präparation siehe unten) gegeben. Wir benützten Säulen von 1,5 cm Durchmesser und schichteten 7 cm hoch.

Es wurde gewaschen:

1) mit 10 ml n-Butanol + 0,01 M Ammoniumhydroxyd
2) mit 10 ml 1 M Essigsäure

Die Elution der delta-Aminolävulinsäure erfolgte mit Eisessig-Methanol (1:2): Zunächst wurden 1,5 ml auf die Säule gegeben, das Eluat wurde verworfen, da es noch keine delta-Aminolävulinsäure enthielt; dann wurde mit 8 ml Eisessig-Methanol (1:2) eluiert. 1 ml Eluat + 1 ml Ehrlichsche Lösung (Präp. siehe unten) ergaben nach 20 Min. Stehen einen roten Farbstoff, der sich als instabil erwies. Nach unseren Erfahrungen erreichte die Farbe nach 20 Min. die höchste Intensität und blaßte danach langsam wieder ab. Im Zeiss Spektralphotometer PMQ 2 wurde bei 556 nm die Extinktion gegen Luft abgelesen. Ein Parallel-Ansatz wurde bei 0 Min. gestoppt und wie die Probe behandelt. Die so bestimmte Extinktion des Nullwertes wurde von der Extinktion der Probe abgezogen.

Die Ergebnisse wurden angegeben als: nMol ALA/h/g Leber Feuchtgewicht.

1) Zur Umrechnung des Farbstoffs in delta-Aminolävulinsäure wurde der von MARVER et al. (16) angegebene molare Extinktionskoef-

fizient von $6,6 \times 10^4$ verwendet ($F_1 = \frac{1}{0,066}$).

2) Die Gesamtmenge der bei der Inkubation gebildeten delta-Aminolävulinsäure war in 8 ml Eisessig-Methanol (1:2) enthalten. Zur Farbreaktion wurde 1:1 mit Ehrlich-Reagenz verdünnt ($F_2 = 16$).

3) In wiederholten Ausbeuteberechnungen, bei denen wir eine genau definierte Menge delta-Aminolävulinsäure auf die Säule gaben, stellten wir fest, daß unter unseren Bedingungen nur 40% eluiert werden konnten ($F_3 = 2,5$).

4) 8 ml 6,25%iges Homogenat entsprechen 0,5 g Leber Feuchtgewicht ($F_4 = 2$).

Also gilt:

$$\text{nMol/Min./g Leber} = \Delta E\ 556 \times F_1 \times F_2 \times F_3 \times F_4 =$$

$$\Delta \frac{E\ 556 \times 16 \times 2,5 \times 2}{0,066} = E\ 556 \times 1,210$$

Vorbehandlung des Anionenaustauschers:

Wir verwendeten Dowex 1-Acetat, das folgendermaßen präpariert wurde: Dowex 1-Chlorid x 8 (200-400 mesh) wurde in die Acetatform überführt mit 20 Volumina 3 M Na-acetat. Anschließend wurde mit 50 Volumina destilliertem H_2O nachgewaschen und mit 0,05 M Na-Acetat-Puffer pH 4,6 äquilibriert.

Ehrlichsches Reagenz (15)

1 g Dimethylaminobenzaldehyd
30 ml Eisessig
8 ml 70%ige $HClO_4$

} mit Eisessig auf 50 ml auffüllen.

5. Bestimmung der ALA-Synthetase im radioaktiven Test (3)

Inkubationsansatz(in 25 ml Erlenmeyerkölbchen):

		Endkonzentration:
1M Glycin	0,2ml	100mM Glycin
0,5M Tris-HCl pH 7,2+0,05M EDTA	0,4ml	100mM Tris-HCl pH 7,2 10mM EDTA
1 µCi 2,3-^{14}C-Succinat (10mCi/mMol)	0,2ml	0,05mM 2,3-^{14}C-Succinat
0,9%ige NaCl	0,2ml	
2%iges Homogenat in 10mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5mM EDTA, 0,9% NaCl	1,0ml	1% Homogenat
Gesamtvolumen	2,0ml	

Nach 30 Min. Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurde die Enzymreaktion mit 0,5 ml 25%iger Trichloressigsäure gestoppt.
Nach 5 Min. Abkühlen wurde bei 5000 Upm 10 Min. zentrifugiert.
Das Sediment wurde mit 5 ml 1%iger Trichloressigsäure gewaschen und abermals zentrifugiert (5000 Upm, 10 Min. lang).
Die vereinigten Überstände wurden mit 3 ml 1 M Acetatpuffer pH 4,8 versetzt, um den sauren Überstand auf pH 3,9 zu puffern. Die entstandene delta-Aminolävulinsäure wurde am Kationenaustauscher Dowex 50 W x 8, Na-Form (200-400 mesh) gereinigt (siehe Präparation des Kationenaustauschers). Säulendurchmesser: 1,5 cm, Schichthöhe: 2 cm.

Es wurde gewaschen:
1) mit 20 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 3,9
2) mit 20 ml Methanol-/, 1 M Acetatpuffer pH 3,9 (2:1)
3) mit 10 ml 0,01 M HCl

Elution der ^{14}C-delta-Aminolävulinsäure:
1,5 ml 1 M NH_4OH (wurde verworfen, da keine delta-Aminolävulinsäure darin nachgewiesen werden konnte).
Dann wurde mit 7 ml 1 M NH_4OH ^{14}C-delta-Aminolävulinsäure eluiert

(^{14}C-delta-Aminolävulinsäure, die wir in genau definierter Menge auf die Säule gaben, konnte zu 100% eluiert werden).
In 0,5 ml des Eluats wurde in 10 ml Brayscher Lösung(Dioxan-Naphthalin-Szintillationsflüssigkeit) die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler der Firma Packard (Tri-Carb, Modell 113003) bestimmt.

Berechnung der Versuchsergebnisse:

Um mit dem colorimetrischen Test vergleichen zu können, wurden alle gemessenen Werte angegeben als: nMol ALA/h/g Leber Feuchtgewicht. Die Umrechnung der Radioaktivität in die Menge an delta-Aminolävulinsäure beruht auf der Voraussetzung, daß die spezifische Radioaktivität des zugegebenen Succinats identisch ist mit der spezifischen Radioaktivität der delta-Aminolävulinsäure. Dabei wurde die Menge des endogenen Succinats vernachlässigt.
Abschätzung des intramitochondrialen Succinat-Pools:
(Für die Berechnung danke ich Herrn Dr. med K.W. Bock, Institut für Toxikologie Tübingen).
2 ml 1% Homogenat entsprechen 0,02 g Leber. Das Mitochondrienvolumen/g Leber entspricht ca. 0,2 ml (25). Das Mitochondrienvolumen im Inkubationsansatz (0,02 g Leber) ist demnach 0,004 ml.Succinat ist überwiegend in den Mitochondrien lokalisiert. Der Succinatspiegel in den Mitochondrien beträgt 0,5 nMol/ml. In einem Lösungsvolumen von 0,004 ml beträgt demnach die Succinatmenge 2 nMol. Die Menge des endogenen Succinatpools ist demnach gering im Vergleich zu 100 nMol zugegebenen Succinats.
Da es bei Markierungsversuchen nicht nur auf die Poolgröße des Succinats sondern auch auf den Turnover ankommt, kann ein Einfluß des endogenen Succinats auf die spezifische Radioaktivität der gebildeten ALA nicht ausgeschlossen werden. Es war deshalb nötig, die mit dem radioaktiven Test ermittelte Menge an delta-Aminolävulinsäure mit einer unabhängigen Bestimmungsmethode zu ver-

gleichen (colorimetrische Methode).

1) Die Umrechnung der IpM in DpM (Radioaktive Zerfälle/Min.) erfolgte unter Berücksichtigung unserer Zählausbeute von 69% ($F_1 = \frac{100}{69}$).
2) 1 µCi = $2{,}2 \times 10^6$ DpM. Bei der spezifischen Radioaktivität des Succinats (10 mCi/mMol) gilt: 100 nMol = 1 µCi = $2{,}2 \times 10^6$ DpM ($F_2 = \frac{100}{2{,}2 \times 10^6}$).
3) 0,5 ml von 7 ml wurden gezählt ($F_3 = 14$).
4) Es wurden 30 Min. inkubiert ($F_4 = 2$).
5) 2 ml 1%iges Homogenat entsprechen 0,02 g Leber Feuchtgewicht ($F_5 = 50$).

Also gilt:

nMol ALA/h/g Leber Feuchtgewicht = IpM x F_1 x F_2 ... x F_5 =

$$\frac{\text{IpM} \times 100 \times 100 \times 14 \times 2 \times 50}{69 \times 2{,}2 \times 10^6} = \text{IpM} \times 0{,}092$$

Vorbehandlung des Kationenaustauschers:

Das Harz wurde durch dreimaliges Erwärmen auf 50°C mit 2 M NaOH in die Na-Form überführt. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser nachgewaschen und mit Acetatpuffer (0,1 M, pH 3,9) äquilibriert.

6. Cytochrom-P-450-Bestimmung nach GREIM (7)

1 ml 20%iges Homogenat wurde in 14 ml KCl-Tris verdünnt und 1 Min. bei 1,5 Amp. beschallt. Die Suspension wurde anschließend 30 sec. lang mit CO begast und auf 2 Küvetten verteilt. Der Inhalt der Meßküvette wurde mit $Na_2S_2O_4$ und der der Vergleichsküvette mit NADH reduziert. Im Leitz-Unicam Sp 800 wurde das Differenzspektrum aufgenommen. Der Extinktionskoeffizient für Cytochrom-P-450 beträgt 91 cm^{-1} mM.

C. Ergebnisse

1. Vergleich der Bestimmung der ALA-Synthetase

a. Zeitkinetik des colorimetrischen Tests

8 Ratten, die 40 Std. gehungert hatten, wurden 300 mg/kg Allylisopropylacetamid i.p. injiziert. 4 Std. später wurden sie getötet, und delta-Aminolävulinsäure in der Leber nach 15 Min., 30 Min. und 60 Min. Inkubation bestimmt. Für einen Meßwert wurden zwei Ratten verwendet. Jeder Versuch wurde doppelt ausgeführt. Gleichzeitig wurde die delta-Aminolävulinsäure in 8 Ratten bestimmt, die ebenfalls 40 Std. hungerten, jedoch keinerlei Medikation erhielten (Kontrollen).

Da sich die Extinktion, die nach 15 Min. Inkubation erhalten wurde, nicht von der Extinktion des Nullwertes unterscheiden ließ, war eine exakte Bestimmung zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

Tabelle 1

ALA-Synthetase				
	ΔE 556/Testansatz		nMol/g Leber	
Inkubationsdauer	30 Min.	60 Min.	30 Min.	60 Min.
Kontrollen				
Experiment 1	0,021	0,041	25	49
Experiment 2	0,015	0,034	18	41
ALA-Behandlung				
Experiment 1	0,041	0,093	50	112
Experiment 2	0,045	0,101	54	120

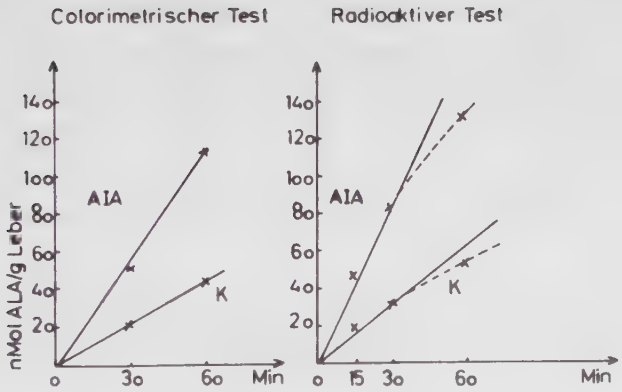
b. Zeitkinetik des radioaktiven Tests

Wie im colorimetrischen Test wurden 8 unbehandelte und 8 behandelte Tiere verwendet, jeder Meßwert doppelt ausgeführt und für jeden Versuch 2 Ratten getötet. Die Leberhomogenate wurden 15 Min., 30 Min. und 60 Min. lang inkubiert.

Tabelle 2

ALA-Synthetase						
	IpM			nMol/g Leber		
Inkubationsdauer	15 Min.	30 Min.	60 Min.	15 Min.	30 Min.	60 Min.
Kontrollen						
Experiment 1	239	348	608	22	32	56
Experiment 2	196	346	567	18	32	52
ALA-Behandlung						
Experiment 1	510	891	1458	47	82	134
Experiment 2	532	935	1472	49	96	135

Bei der Aufstellung der Zeitkinetik sowohl mit dem colorimetrischen als auch mit dem radioaktiven Test zeigte sich eine größere Sensibilität des letzteren. Bereits nach 15 Min. Inkubation war ein Anstieg der delta-Aminolävulinsäure feststellbar, während sich die im colorimetrischen Test erhaltenen Werte nicht von unseren Nullwerten unterscheiden ließen. Die delta-Aminolävulinsäureproduktion war im colorimetrischen Test bis 60 Min. linear; im radioaktiven dagegen bis 30 Min.



c. Vergleich der Bestimmung des colorimetrischen und des radioaktiven Tests im Verlauf der Induktion der ALA-Synthetase durch Allylisopropylacetamid.

8 Ratten, die 40 Std. gehungert hatten, injizierten wir 300 mg/kg Allylisopropylacetamid intraperitoneal. 4, 8, 24 und 48 Std. später bestimmten wir den delta-Aminolävulinsäurespiegel in der Leber sowohl mit dem colorimetrischen als auch mit dem radioaktiven Test. Die Enzymaktivität zweier unbehandelter Ratten, die ebenfalls 40 Std. gehungert hatten, bildete den Nullwert. Um die Ergebnisse zu erhärten, führten wir zwei analoge Versuchsreihen durch.

Experiment 1:

	colorimetrischer Test		radioaktiver Test	
Zeit (h)	ΔE 556	nMol ALA/h/g Leber	IpM	nMol ALA/h/g Leber
0	0,031	38	445	41
4	0,155	184	1989	183
8	0,095	115	1771	163
24	0,076	92	923	85
48	0,008	10	326	30

Experiment 2:

	colorimetrischer Test		radioaktiver Test	
Zeit (h)	ΔE 556	nMol ALA/h/g Leber	IpM	nMol ALA/h/g Leber
0	0,033	40	489	45
4	0,095	115	170	157
8	0,165	199	2250	207
24	0,073	88	923	85
48	0,035	42	326	30

Beim Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden im Verlauf der Induktion der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase durch Allylisopropylacetamid war eine gute Übereinstimmung der mit Hilfe beider Verfahren erhaltenen Enzymaktivität festzustellen. Im 1. Experiment erreichte die delta-Aminolävulinsäure ihren höchsten Wert nach 4 Stunden, im 2. Experiment nach 8 Stunden. Anschließend sank der delta-Aminolävulinsäurespiegel allmählich ab, um nach 48 Stunden nahezu den Ausgangswert zu erreichen. Die etwas höheren Werte des radioaktiven Tests wurden auf geringe Abweichungen der spezifischen Radioaktivität der ^{14}C-delta-Aminolävulinsäure vom vorausgesetzten Wert von 10 mCi/mMol zurückgeführt.

d. Identifizierung und Reinheitsbestimmung der delta-Aminolävulinsäure durch Dünnschichtchromatographie nach IRVING et al. (8)

a. Radioaktiver Test

Ca. 10 ml Eluat wurden gesammelt und mit konzentrierter HCl neutralisiert. Danach wurden folgende Reagenzien in ein Kochglas überführt wie im Farbtest:

11 ml 1 M Na-Acetat-Puffer pH 4,6
0,6 ml Acetylaceton
11 ml neutralisiertes Eluat

Nach 20 Min. Kochen und Abkühlen wurde die Pyrrol-Lösung auf eine Dowex-1-acetat-säule gegeben und wie im colorimetrischen Test eluiert. Das Eisessig-Methanol-haltige Eluat wurde mit 10 ml NaOH neutralisiert und im Scheidetrichter mit 25 ml Äthylacetat ausgeschüttelt. Da das in das Salz überführte Elutionsmittel im Ester nicht löslich ist, enthält die obere Phase die aus delta-Aminolävulinsäure gebildeten Pyrrole und Methanol. Letzteres wurde mit H_2O ausgeschüttelt.
Im Rotationsverdampfer wurden die Pyrrole auf ca. 1 ml konzentriert und mit 1 ml Methanol versetzt.

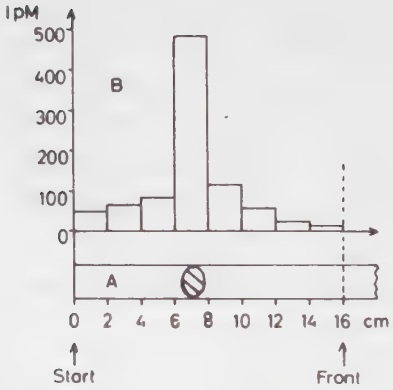
b. Colorimetrischer Test

Das Eluat konnte direkt mit NaOH neutralisiert werden. Anschliessend wurde das oben angeführte Verfahren angewandt.

Eine Vergleichslösung bekannter delta-Aminolävulinsäure, die ebenfalls in einen Pyrrolkörper überführt und mit Methanol versetzt worden war, wurde neben den Pyrrolen des radioaktiven und des colorimetrischen Tests auf Kieselgel-Platten aufgetragen.
Als Laufmittel verwendeten wir Methylacetat-Isopropylalkohol-25%ige NaOH (45:35:20 v/v). Nach ca. 2 1/2 Std. Laufzeit und

Trocknen wurde die Platte mit Ehrlichschem Reagenz (5%ige p-DAB in 1 n HCl) besprüht.

Bei Rf 0,5 konnte sowohl ein roter Farbfleck (A) als auch eine Konzentrierung der radioaktiven Substanz (B) festgestellt werden. Daraus geht hervor, daß die mit Ehrlichschem Reagenz nachweisbaren bzw. durch ihre hohen ^{14}C-Einbau charakterisierten Pyrrole aus delta-Aminolävulinsäure entstanden sind.



2. Induktion der delta-Aminolävulinsäure-Synthetase nach Allylisopropylacetamid-Injektion bei hungernden und ad libitum gefütterten Ratten.

Um einen Vergleich der Induktion der ALA-Synthetase in hungernden und gefütterten Ratten anstellen zu können, wurden die unter 1c. in zwei Versuchsreihen gewonnenen delta-Aminolävulinsäure-Werte ge-

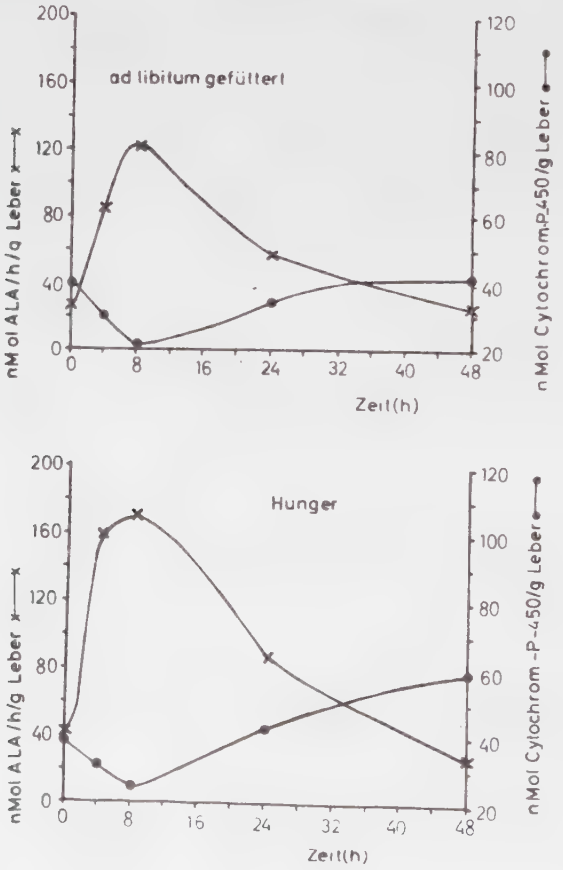
mittelt und mit den Mittelwerten aus zwei Versuchsreihen mit gefütterten Tieren verglichen, die ebenfalls 300 mg/kg Allylisopropylacetamid erhielten. Die Enzymaktivität von jeweils zwei gefütterten und zwei hungernden Ratten ohne Medikation bildete den Nullwert. Wieder wurde gleichzeitig das colorimetrische und das radioaktive Verfahren angewandt.

Zeit nach Allylisopropylacetamidbehandlung	Enzymaktivität			
	Hunger		gefüttert	
	radioaktiver Test	colorimetrischer Test	radioaktiver Test	colorimetrischer Test
h	nMol/h/g Leber		nMol/h/g Leber	
0	39	43	22	31
4	151	170	73	97
8	157	185	101	146
24	90	85	43	72
48	26	30	21	26

Aus unseren Versuchen geht deutlich hervor, daß die Induktion der ALA-Synthetase vom Ernährungszustand der Ratten abhängt. Bereits der Nullwert wies bei hungernden Tieren eine höhere ALA-Synthetase-Aktivität auf als bei gefütterten Ratten. Bei den Hungertieren war nach 4 Std. eine Steigerung der ALA-Synthetase auf das Vierfache des Ausgangswertes feststellbar, während gefütterte Ratten zu diesem Zeitpunkt einen dreifachen Anstieg zeigten. Nach 8 Std. war bei gefütterten und ungefütterten ein Maximum in der Induktion zu verzeichnen. Nach 24 Std. sank die Enzymaktivität allmählich ab, um 48 Std. später einen Wert zu erreichen, der etwas unter dem Ausgangswert lag.

3. Induktion der ALA-Synthetase durch Allylisopropylacetamid bei hungernden und ad libitum gefütterten Tieren. Vergleich mit der Induktion des Cytochrom-P-450.

Die unter 2. erhaltenen Werte der ALA-Synthetaseaktivität nach Applikation von 300 mg/kg Allylisopropylacetamid in hungernden und gefütterten Tieren wurden mit der Aktivität des Cytochrom-P-450 unter denselben Bedingungen verglichen.



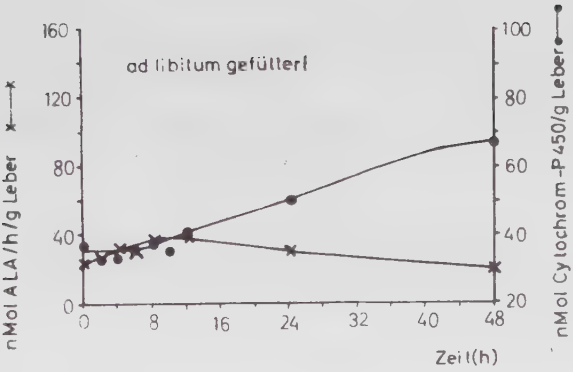
Die in der Kurve angeführten delta-Aminolävulinsäure-Werte sind Mittelwerte des colorimetrischen und des radioaktiven Testverfahrens. Cytochrom-P-450 wurde ebenfalls 4, 8, 24 Sund 48 Std. nach Injektion von Allylisopropylacetamid bestimmt.

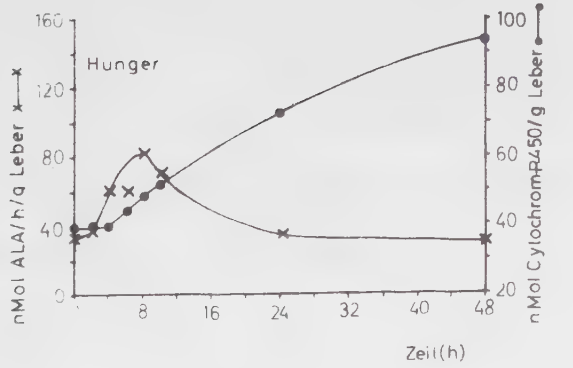
Beim Vergleich der Induktion des Cytochrom-P-450 mit der Induktion der ALA-Synthetase in hungernden und gefütterten Ratten, fällt auf, daß während die ALA-Synthetase nach 8 Std. ihr Maximum erreicht, die Aktivität des Cytochrom-P-450 nach der Allylisopropylacetamid-Injektion sinkt und nach 8 Std. ihren tiefsten Punkt erreicht. Das gilt sowohl für gefütterte als auch für hungernde Ratten. Nach 48 Std. ist bei gefütterten der Ausgangswert wieder erreicht, während bei Hungertieren nach 48 Std. noch eine Induktion des Cytochrom-P-450 festzustellen ist.

4. Induktion der ALA-Synthetase durch Phenobarbital bei hungernden und ad libitum gefütterten Ratten.

Hungernden und ad libitum gefütterten Ratten wurden 100 mg/kg Phenobarbital i.p. injiziert. Nach 4, 8, 24 und 48 Std. wurde die ALA-Synthetaseaktivität mit Hilfe beider Testverfahren bestimmt. Für jeden Einzelversuch verwendeten wir wieder zwei Lebern und führten jede Versuchsreihe doppelt aus. Anschließend bildeten wir die Mittelwerte der nach beiden Bestimmungsmethoden erhaltenen Ergebnisse. Der delta-Aminolävulinsäure-Spiegel in den Lebern unbehandelter gefütterter bzw. hungernder Ratten bildete unseren Nullwert. Gleichzeitig bestimmten wir die Induktion des Cytochrom-P-450 durch Phenobarbital bei hungernden und gefütterten Tieren.

Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind auf S. 27a in Diagrammform dargestellt.


ad libitum gefüttert
nMol ALA/h/g Leber
nMol Cytochrom-P450/g Leber
Zeit(h)
0
40
80
120
160
20
40
60
80
100
8
16
24
32
40
48


Hunger
nMol ALA/h/g Leber
nMol Cytochrom-P450/g Leber
Zeit(h)
0
40
80
120
160
20
40
60
80
100
8
16
24
32
40
48

Wir konnten feststellen, daß die ALA-Synthetaseaktivität nach Phenobarbitalbehandlung bei Hungertieren stark anstieg, während bei gefütterten keine signifikante Aktivitätssteigerung zu beobachten war. Cytochrom-P-450 wurde bei Hungertieren stark induziert, aber auch bei gefütterten Ratten war nach 48 Std. noch nahezu die doppelte Enzymaktivität des Ausgangswertes nachweisbar, ohne daß eine Induktion der ALA-Synthetase vorausging.

5. Induktion der ALA-Synthetase nach chronischer Applikation von Phenobarbital bei gefütterten Tieren. Vergleich mit der Induktion des Cytochrom-P-450.

6 Ratten wurden täglich 100 mg/kg Phenobarbital i.p. injiziert. 2 bzw. 4 Tage nach Beginn der Behandlung wurden 3 Ratten getötet. und sowohl die ALA-Synthetase als auch die Cytochrom-P-450-Aktivität bestimmt. Gleichzeitig wurde in jeweils 3 unbehandelten Kontrolltieren beide Enzymaktivitäten gemessen. Jeder Versuch wurde nach beiden Testverfahren und jeweils doppelt ausgeführt. In der unten angeführten Tabelle sind die Mittelwerte aus beiden Versuchsreihen und aus beiden Testverfahren gebildet worden.

Zeit	Behandlung	ALA-Synthetase	Cytochrom-P-450
Tage		nMol/h/g Leber	nMol/h/g Leber
2	Kontrolle	41	37
	Phenobarbital	46	67
4	Kontrolle	42	38
	Phenobarbital	46	72

Wenn gefütterten Ratten täglich Phenobarbital injiziert wird bis nach 4 Tagen ein Fließgleichgewicht von Cytochrom-P-450 erreicht ist, ist kein Anstieg der ALA-Synthetaseaktivität zu verzeichnen.

D. Diskussion

Beim Vergleich der beiden Bestimmungsmethoden fiel auf, daß der radioaktive Test eine größere Empfindlichkeit besitzt als das colorimetrische Verfahren. Schon bei der Aufstellung der Zeitkinetik war eine delta-Aminolävulinsäure-Bestimmung nach 15 Min. Inkubation mit dem Farbtest nicht durchführbar, da die erhaltenen Ergebnisse sich nicht von den Nullwerten unterscheiden ließen. Eine exakte Messung der delta-Aminolävulinsäure-Aktivität war nach dem colorimetrischen Test erst möglich, wenn größere Mengen delta-Aminolävulinsäure vorlagen wie z.B. nach Applikation des porphyrieerzeugenden Stoffes Allylisopropylacetamid. Unter diesen Bedingungen erwies sich der Farbtest als zuverlässig und wenig störanfällig. Beim radioaktiven Verfahren jedoch beeinflußten kleinste Abweichungen der spezifischen Radioaktivität der ^{14}C-ALA vom vorausgesetzten Wert von 10mCi/mMol die Ergebnisse. Andererseits ermöglichte die größere Empfindlichkeit des radioaktiven Tests auch die Bestimmung des nicht induzierten delta-Aminolävulinsäure-Spiegels in der Leber. Da beide Testverfahren auf verschiedenen Prinzipien beruhen, ist die Übereinstimmung beider Testergebnisse ein Hinweis dafür, daß auch der sehr empfindliche jedoch störanfällige radioaktive Test brauchbare Werte liefert.

Die Aktivität der ALA-Synthetase nach Allylisopropylacetamid-Behandlung hungernder Ratten, zeigte sowohl im colorimetrischen als auch im radioaktiven Test 4-8 Std. nach der Injektion einen starken Anstieg.

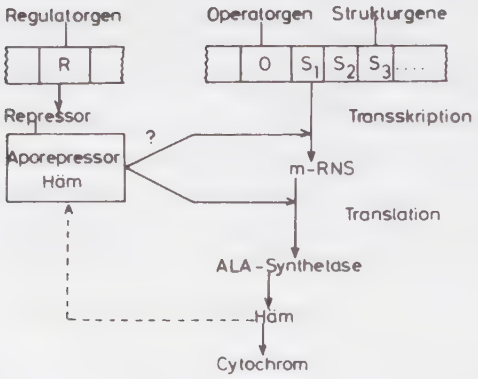
Den Wirkungsmechanismus dieser Porphyrieerzeugung erklärt man sich folgendermaßen (17 , 19):

Allylisopropylacetamid wird an Cytochrom-P-450 zu einem bisher unbekannten Derivat metabolisiert, das Cytochrom-P-450 und Häm zerstört. In unseren Versuchen wird 8 Std. nach der Injektion des

Medikamentes ein starker Abfall des Cytochrom-P-450 sichtbar. Die gleichzeitig bestimmte ALA-Synthetase ist zu diesem Zeitpunkt maximal induziert. Nach Zerstörung des Cytochrom-P-450 und Absinken des Häm-Spiegels tritt ein positiver Rückkopplungsmechanismus in Kraft, der die Schädigung des Cytochrom durch verstärkte Neusynthese auszugleichen sucht. Die Hämsynthesevermehrung ist durch eine Steigerung der ALA-Synthetaseaktivität möglich (6). Diese Aktivitätssteigerung ist wie GRANICK in Versuchen mit Proteininhibitoren bewies, auf eine vermehrte Enzymproduktion zurückzuführen (5).

Die Endproduktkontrolle der Hämsynthese durch Repression bzw. Induktion der ALA-Synthetase erklärte GRANICK damit, daß er einen Repressor der Enzymsynthese forderte, der aus einem Corepressor und Häm als Aporepressor besteht.

Den Wirkungsmechanismus stellt man sich folgendermaßen vor:



Nach der Theorie von JACOB und MONOD(10) ist der Repressor sowohl für das Operator-Gen als auch für die induzierende Substanz spezifisch. Gelangt der Induktor in die Zelle, dann verbindet er sich mit dem Repressor und dieser ist nicht mehr in der Lage, das Operator-Gen zu blockieren. Die Synthese der m-RNS und damit die Proteinsynthese kommt in Gang. GRANICK (6) vertritt die Hypothese, daß die induzierenden Substanzen wegen ihrer chemischen Ähnlichkeit mit Häm dessen Bindung an seinen Aporepressor kompetitiv hemmen.

Im Gegensatz zu hungernden Tieren ist die ALA-Synthetase nach Allylisopropylacetamid-Behandlung bei gefütterten Tieren deutlich weniger induziert. Die Fähigkeit der Glucose, die Synthese bestimmter Enzyme zu reprimieren, ist schon länger bekannt. EPPS und GALE (4) beschrieben zum ersten Male dieses Phänomen und nannten es Glucose-Effekt. MAGASANIK (13), der von Kataboliten-Repression spricht, ist der Meinung, daß sich Glucosemetaboliten in der Zelle ansammeln und die Bildung derjenigen Enzyme unterdrücken, die in der Lage sind, ihre Substrate in Metaboliten umzuwandeln, die auch im Glucosestoffwechsel entstehen.

In ihren Untersuchungen über den Effekt der Kohlehydratfütterung auf die Induktion der ALA-Synthetase bei mit Allylisopropylacetamid behandelten Tieren stellte TSCHUDY (25) ebenfalls eine starke Senkung der Enzymaktivität nach Fütterung fest. Er ist der Meinung, daß der Ernährungszustand ein wichtiger Regulator der Hämsynthese bei experimentellen Porphyrien ist.

Es ist bekannt, daß eine einmalige Gabe von Phenobarbital bei Ratten das Häm des Cytochrom-P-450 vermehrt, indem es seine Synthese steigert (7). Wie MARVER (15) konnten wir einen Anstieg der ALA-Synthetaseaktivität bei hungernden Tieren nach Behandlung mit Phenobarbital feststellen, der von einer Vermehrung des Cytochrom-P-450 um das Dreifache des Ausgangswertes gefolgt wurde.

Der Anstieg des Cytochrom ist jedoch bei gefütterten Ratten deutlich geringer als bei hungernden. GREIM (7) beschrieb die Tatsache, daß der Abbau des Häm nach einmaliger Gabe von Phenobarbital zunächst unbeeinflußt bleibt und sich erst nach mehrtägiger Behandlung der gesteigerten Synthese anpaßt. Das relative Überwiegen der Synthese führt zur Vermehrung der mikrosomalen Häme und Cytochrome. Die intensive Cytochromvermehrung, die wir bei hungernden mit Phenobarbital behandelten Ratten verzeichnen konnten, ist darauf zurückzuführen, daß die gesteigerte Synthese durch eine Hemmung des Abbaus verstärkt wird.

Während nach Phenobarbitalbehandlung bei gefütterten Tieren kein signifikanter Anstieg der ALA-Synthetase verzeichnet werden, war Cytochrom-P-450 auf das Doppelte des Ausgangswertes angestiegen. Kein Anstieg der ALA-Synthetase war auch zu verzeichnen, wenn gefütterte Tiere täglich Phenobarbital injiziert bekamen, bis ein neues Fließgleichgewicht von Cytochrom erreicht war.

Es besteht ein klarer Unterschied zwischen dem Wirkungsmechanismus der Medikamente Allylisopropylacetamid und Phenobarbital. Während Phenobarbital die Konzentration des Cytochrom-P-450 und Häm vermehrt ohne daß sich Porphyrinvorstufen in der Leber ansammeln, zerstört Allylisopropylacetamid Cytochrom und Häm und löst den oben erwähnten Feed-back-Mechanismus aus. Gleichzeitig kann durch Allylisopropylacetamid eine experimentelle Porphyrie erzeugt werden, was sich in einer Anreicherung von Porphyrinen in der Leber manifestiert (17). Wie nach Allylisopropylacetamidbehandlung ist bei der akuten intermittierenden Porphyrie die ALA-Synthetase-Aktivität stark erhöht. Dies führt zu einer Überproduktion von delta-Aminolävulinsäure und Porphobilinogen. Die überschüssigen Produkte werden im Urin ausgeschieden. MEYER et al. (20) zeigten in ihren neuesten Untersuchungen, daß die akute intermittierende Porphyrie auf einem Defekt der Uropophyrinogen-1-Syn-

thetase beruht. Diese autosomal dominant erbliche Krankheit führt zu einem Block in der Hämsynthese und einer sekundären Induktion der ALA-Synthetase. Die Autoren untersuchten eine ganze Familie, in der vermehrt Porphyrien aufgetreten waren, im Hinblick auf diesen Enzymdefekt. Sie machten die Entdeckung, daß auch bei klinisch völlig symptomfreien Familienmitgliedern ein Defekt der Uroporphyrinogen-1-Synthetase vorlag. Schon lange bekannt ist die Tatsache, daß Porphyriker auf die Applikation von bestimmten Medikamenten wie z.B. Phenobarbital oder Griseofulvin mit einem akuten Porphyrieanfall reagieren (25). Das wird verständlich, wenn man bedenkt, daß dadurch die ALA-Synthetase induziert wird und vermehrt Hämvorstufen anfallen. Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß die Aktivität der ALA-Synthetase vom Ernährungszustand der Versuchstiere abhängt. Auf die Klinik bezogen würde das bedeuten, daß Porphyriker auf keinen Fall hungern dürfen, wozu ihre Bauchsymptomatik verleiten könnte, sondern im Gegenteil eine hochkalorische Diät erhalten müssen. TSCHUDY (26) ist der Ansicht, daß Diät eine Kontrollfunktion der Porphyrinbiosynthese in der Leber von Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie ausübt. WELLAND et al. (28) untersuchten den Effekt von kohlehydratreicher Kost im akuten Anfall und stellten fest, daß die Ausscheidung von Porphyrinvorstufen im Harn umgekehrt proportional der Aufnahme von Kohlehydraten oder Proteinen ist.

Es ist bisher nicht gelungen, einen Zusammenhang zwischen den Symptomen der akuten intermittierenden Porphyrie (wie Hypertonie, akute intermittierende Abdominalschmerzen, akute Polyneuropathie und andere neurologische Symptome)und der erhöhten Konzentration von Hämvorstufen in der Leber und im Urin zu finden. Diese Beziehung ist jedoch zu fordern, wenn die Ursache der Porphyrie allein auf einer Störung des Hämstoffwechsels beruht.

E. Zusammenfassung

Bei ad libitum gefütterten und hungernden Ratten wurde die Wirkung von Arzneimitteln auf das Schrittmacherenzym der Häm-Synthese delta-Aminolävulinsäure-Synthetase (ALA-Synthetase) untersucht.

1. Ein colorimetrischer und ein radioaktiver Test der ALA-Synthetase wurden verglichen. Beide Testsysteme ergaben vergleichbare Ergebnisse. Der radioaktive Test war jedoch einfacher, empfindlicher und ermöglichte Enzymbestimmungen bei geringeren Mengen an Lebergewebe.
2. Nach einmaliger Behandlung von gefütterten Ratten mit Allylisopropylacetamid (dem porphyrieerzeugenden Anteil des früher als Schlafmittel verwendeten Sedormid ^{R}) wird Cytochrom-P-450 zerstört und die ALA-Synthetase induziert.
Die Induktion der ALA-Synthetase durch Allylisopropylacetamid jedoch nicht die Zerstörung von Cytochrom-P-450 war stärker in hungernden Tieren.
3. Nach einmaliger Behandlung von Ratten mit Phenobarbital wurde Cytochrom-P-450 induziert: Die Induktion war stärker bei hungernden Tieren.
Die ALA-Synthetase wurde bei gefütterten Tieren nicht signifikant induziert.
Bei hungernden Tieren dagegen war nur innerhalb 10 Stunden nach der Behandlung eine Induktion nachweisbar.
4. Nach einer Dauerbehandlung von Ratten mit Phenobarbital war ebenfalls keine signifikante Induktion der ALA-Synthetase nachweisbar, trotz der Induktion von Cytochrom-P-450.
Die Befunde weisen auf die Bedeutung des Ernährungszustandes bei der Auslösung von porphyrischen Anfällen durch Arzneimitteln hin.

F. Literatur

1. CONNEY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.
Pharmacol.Rev. 19, 317-366 (1967)

2. CUCINELL, S.A., A.H. CONNEY, M. SANSUR and J.J. BURNS: Drug interactions in man. Lowering effect of phenobarbital on plasma levels of bishydroxycumarin (Dicumarol) and diphenylhydantoin (Dilantin).
Clin.Pharmacol.Ther. 6, 420-429 (1965)

3. EBERT, P.S., D.P. TSCHUDY, J.N. CHOUDHRY and M.A. CHIRIGOS: A simple micro method for the direct determination of delta-amino-^{14}C-levulinic acid production in murine spleen and liver homogenates.
Biochim.Biophys. Acta 208, 236-250 (1970)

4. EPPS, H.M.R. and E.F. GALE: The influence of the presence of glucose during growth on the enzymatic activities of Eschericia coli: Comparison of the effect with that produced by fermentation acids.
Biochem.J. 36, 619-624 (1942)

5. GRANICK, S.J.: The induction in vitro of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals.
J.Biol.Chem. 241, 1359-1375 (1966)

6. GRANICK, S.J. and G.J. URATA: Increase in activity of delta-aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3,5-dicarbethoxy-1,4dihydrocollidine.
J.Biol.Chem. 283, 821-827 (1963)

7. GREIM, H.: Synthesesteigerung und Abbauhemmung bei der Vermehrung der mikrosomalen Cytochrome P-450 und b-5 durch Phenobarbital. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 266, 261-275 (1970)

8. HELD, H. und OLDERSHAUSEN, H.F. von: Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der Induktion der delta-Aminolaevulinsäuresynthetase, des Hexobarbital-abbauenden Enzyms und von Cytochrom-P-450 in der Rattenleber und Phenobarbital.
Klin. Wschr. 47, 1234-1235 (1969)

9. IRVING, E.A. and W.H. ELLIOTT: A sensitive radiochemical assay method for delta-aminolevulinic acid synthetase.
J.Biol.Chem. 244, 60-67 (1969)

10. JACOB, F. and J. MONOD: Genetic regulatory mechanismus in the synthesis of proteins.
J.Molec.Biol. 3, 318-356 (1961)

11. KARLSON, P.: Biochemie, 6. Aufl. Stuttgart: Thieme 1967

12. KUPFER, D. and R. PARTRIDGE: 6-beta-hydroxylation of triamcinolone acetonide by a hepatic enzyme system. The effect of phenobarbital and 1-Benzyl-2-thio-5,6-dihydrouracil. Arch.Biochem. 140, 23-28 (1970)

13. MAGASANIK, B.: Catabolite repression. Sympos.Quant.Biol. 26, 249-256 (1961)

14. MARVER, H.S.: The role of heme in the synthesis and repression of microsomal protein. Microsomes and Drug oxidation. Academic Press 495-511 (q1969)

15. MARVER, H.S., D.P. TSCHUDY, M.G. PERLROTH and A. COLLINS: Delta-aminolevulinic acid synthetase. J.Biol.Chem. 241, 2803-2809 (1966)

16. MARVER, H.S., D.P. TSCHUDY, M.G. PERLROTH, A. COLLINS and G. HUNTER jr.: The determination of aminoketones in biological fluids. Anal.Biochem. 14, 53-60 (1966)

17. De MATTEIS, F.: Rapid loss of cytochrom P-450 and haem caused in the liver microsomes by the porphyrinic agent 2-allyl-2-isopropylacetamid. FEBS Letters 6, 343-345 (1970)

18. MAUZERALL, D. and S.O. GRANICK: Occurence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. J.Biol.Chem. 219, 435-446 (1956)

19. MEYER, U.A. and H.S. MARVER: Chemically induced porphyria: increased microsomal heme turnover after treatment with allylisopropylacetamid.
Science 171, 64-66 (1971)

20. MEYER, U.A., C.J. STRAND, M. DOSS, A.C. REES and H.S. MARVERP: Intermittent acute porphyria-demonstration of a genetic defect in porphobilinogen metabolism.
New Engl.J.Med. 286, 1277-1282 (1972)

21. REMMER, H.: The induction of hydroxylating enzymes by drugs.
FEBS Symposium 16, 125-141 (1969)

22. REMMER, H.: The role of the liver in drug metabolism.
Amer.J.Med. 49, 617-629 (1970)

23. SCHOENE, B., R.A. FLEISCHMANN, H. REMMER and F.H. v. OLDERSHAUSEN: Determination of Drug Metabolizing Enzymes in Needle Biopsies of Human Liver.
Europ.J.clin.Pharmacol. 4, 65-73 (1972)

24. SIEGENTHALER, W.: Klinische Pathophysiologie
Stuttgart: Thieme 1970

25. TSCHUDY, D.P.: Biochemical lesions in Porphyria.
Jama 191, 718-730 (1965)

26. TSCHUDY, D.P., F.H. WELLAND, A. COLLINS and G. HUNTER: The effect of carbohydrate feeding on the induction of delta-aminolevulinic acid synthetase.
Metabolism 13, 396-406 (1964)

27. WEIBEL, E.R., W. STÄUBLI and H.R. GNÄGI: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. Morphometric model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver.
J.Cell Biol. 42, 68-91 (1969)

28. WELLAND, F.H., E.S. HELLMANN, E.M. GADDIS, A. COLLINS, G.W. HUNTER and D.P. TSCHUDY: Factors affecting the excretion of porphyrin precursors by patients with acute intermittent porphyria. The effect of diet.
Metabolism 13, 232-250 (1964).

Herrn Professor Dr. H. Remmer danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K.W. Bock für die wertvollen Ratschläge und die jederzeit gern gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 5. Mai 1948 wurde ich, Eva Krauß, als Tochter des Kaufmanns Hugo Krauß und seiner Frau Hildegard geb. Schall in Stuttgart geboren.

Von 1955 - 1959 besuchte ich dort die Wagenburg-Grundschule. Anschließend trat ich in das Evangelische Heidehofgymnasium in Stuttgart ein. 1967 bestand ich das Abitur und begann im selben Jahr das Medizinstudium an der Universität Tübingen, das ich im Januar 1974 mit der ärztlichen Prüfung abschloß.

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Konigstr. 51
Telefon (0711) 29 56 81/29 10 63

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Konigstr. 51
Telefon (0711) 29 56 81/29 10 63